Standar Nasional Indonesia

SNI 01-2336-1991

Penentuan shigella

ICS 67.120.30

Badan Standardisasi Nasional

Daftar isi

Penentuan shigella

0 Pendahuluan

Genus Shigella terdiri dari 4 spesies : Shigella dysenteriae (sub grup A), S. flexneri (sub grup B), S. boydii (sub grup C) dan S. sonnei (sun grup D). Mereka adalah gram negatif aerobik, tidak membentuk spora, tidak bergerak, berbentuk bulat, dan termasuk dalam famili Enterobacteriaceae. Mereka tidak mendekarboksilase lisin dan tidak memfermentasi laktose; gula dan karbohidrat lain difermentasi dengan menghasilkan asam, tetapi tidak memproduksi gas. Sitrat dan Mallonat tidak digunakan, dan organisma tersebut dihambat pertumbuhannya oleh KCN.

Makanan yang disangsikan dapat berupa makanan yang memperoleh penanganan dengan tangan atau sedikit pemanasan sebelum dikonsumsi. Makanan itu dapat berasal dari binatang, atau produk segar yang langsung dikonsumsi. Btasanya makanan itu mempunyai pH antara 5,5-7,5. Pada umumnya makanan yang diperkirakan mempunyai coliform, E. coli, dan Salmonella dimungkinkan juga mengandung Shigella.

1 Peralatan

Sama dengan Salmonella.

2 Media dan reagensia

2.1 Shigella somatic antisera poly groups A, Al, B, C, C1, C2, D dan A - D.
2.2 Brain Heart Infusion (BHI).
2.3 Carbohydrate fermentation broth.
2.4 Deoxycholate citrate agar (DC).
2.5 Media Koser's citrate.
2.6 Buffered glucosa broth (media MR-VP).
2.7 Tryptone broth.
2.8 Potassium Cyanide broth (KCN).
2.9 Levine's eosine methylene blue agar (L-EMB).
2.10 Mallonate broth.
2.11 Media Tes Pergerakan (motility).
2.12 Nutrient agar.
2.13 Nutrient broth.
2.14 Selenite cystine broth (SCB).
2.15 Triple sugar iron agar (TSI).
2.16 Urea broth.
2.17 Xylose lysine decarboxylase agar (XLD).

2.18 Larutan Alpha - naphtol.
2.19 Larutan Kovac.
2.20 Larutan Methyl red (M-R).
2.21 Larutan Normal saline, 0,85%.
2.22 ReagensiaVoges-Proskauer (VP).
2.23 Pewarnaan gram.
2.24 Purple Carbohydrat Broth.

3 Pengkayaan

3.1 Secara aseptis timbang 2 g contoh ke dalam wadah bermulut lebar dan bertutup yang steril.
3.2 Tambahkan 225 ml SCB dan aduk hingga homogen.
3.3 Kendurkan tutup wadah dan inkubasi selama semalam (16± 2 jam) pada suhu 35°C.
3.4 Goreskan pada XLD, DC dan EMB.

4 Isolasi

4.1 Inkubasi agar tersebut pada suhu 35°C selama 24± 2 jam.

4.2 Perhatikan koloni tersangka dengan ciri-ciri.

4.2.1 Pada EMB dan DC Shigella kelihatan berwarna abu-abu bercahaya atau koloni berwarna abu-abu yang terselubung lapisan batu-batuan halus yang tipis. Ukuran dari koloni beragam.
4.2.2 Pada XLD, koloni kelihatan berwarna merah muda yang dikelilingi lingkaran kemerahan yang terlihat dengan penerangan yang cukup.

4.3 Ambil 2 atau lebih koloni tersangka dari ketiga agar tersebut dan inokulasi pada TSI agar miring.

4.4 Inkubasi TSI tersebut pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam. Shigella memberikan reaksi alkalin (merah) pada agar miring, asam (kuning) pada busukan, tidak ada gas, dan tidak ada H_2 S yang terbentuk.

5 Indentifikasi shigella

5.1 Tes crease.

Pindahkan koloni positif dari TSI ke rapid urea broth dengan menggunakan jarum inokulasi berdiamater dan inkubasi pada suhu 37 ± 0,5°C selama 2 jam. Shigella memberikan reaksi negatif. Buang semua koloni yang memberikan reaksi positif (ungu).

5.2 Nutrient broth

Inokulasi' nutrient broth dengan koloni tersangka dari TSI. Gunakan kontrol.

5.3 Nutrient agar

Inokulasi nutrient agar miring dengan koloni tersangka dari TSI. Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.

5.4 Reaksi gram

Dari nutrient agar miring siapkan pewarnaan gram. Shigella berbentuk bulat, gram negatif ukuran 1 - 3 p dengan ukuran paling kecil 0,4 - 0,6 u, tidak berkapsul, tidak membentuk spora dan tumbuh sendiri-sendiri.

5.5 Tes pergerakan

Inokulasi tabung yang berisi motility test medium dengan koloni tersangka dari TSI, dengan memasukkan jarum inokulasi sampai kedalaman 5 mm. Inkubasi pada suhu 35°C selama 1-2 hari. Pertumbuhan yang melingkar yang berasal dari tempat tusukkan menunjukkan adanya tes positif. Shigella tidak bergerak (negatif).

6 Tes biokimia

Apabila koloni tersangka tersebut adalah gram negatif, tidak bergerak, reaksi urease negatif, teruskan dengan pengujian selanjutnya.

6.1 KCN

Inokulasi dengan koloni yang berasal dari nutrient broth yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan menggunakan jarum inokulasi berdiamater. Inkubasi pada suhu 35°C selama 48 ± 2 jam. Reaksi positif menunjukkan adanya pengendapan dalam tabung. Shigella memberikan reaksi negatif.

6.2 Mallonate broth

Inokulasi dengan koloni yang berasal dari nutrient broth yang telah diinkubasi 24 jam dengan menggunakan jarum inokulasi berdiamater. Inkubasi pada suhu 35°C selama 48 ± 2 jam. Reaksi positif menunjukkan adanya perubahan warna dari hijau ke biru tua. Shigella memberikan reaksi negatif.

6.3 Tes MR-VP

Inokulasi tabung berisi MR - VP dari nutrient agar miring. Inkubasi pada suhu 35°C selama 48 ± 2 jam.

6.3.1 Tes VP

Pindahkan 1 ml kultur yang telah diinkubasi selama 48 jam ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 0,6 ml alpha naphthol dan aduk. Tambahkan 0,2 ml NaOH 40% dan aduk. Baca

hasilnya dalam 4 jam. VP positif memberikan warna merah muda eosin. Shigella memberikan reaksi negatif.

6.3.2 Tes MR

Pindahkan 5 ml kultur yang telah diinkubasi selama 48 jam ke tabung reaksi dan tambahkan 5-6 tetes Methyl red. Baca hasilnya segera. MR positif menunjukkan warna merah. Shigella memberikan reaksi positif.

6.4 Penggunaan sitrat

Inokulasi tabung yang berisi medium Koser's citrate dengan koloni yang berasal dari nutrient agar miring (usahakan memindahkan sel seminimum mungkin). Inokulasi medium tersebut sedikit di bawah permukaan medium. Inkubasi pada suhu 35°C selama 4—5 hari. Reaksi positif menunjukkan terbentuknya endapan yang terlihat jelas pada medium. Shigella memberikan reaksi negatif.

6.5 Fermentasi karbohidrat

Inokulasi gula-gula broth dengan koloni yang berasal dari nutrient agar. Inkubasi 4-5 hari pada suhu 35°C. Periksa terjadinya asam dan gas setiap hari.

Karbohidrat	Asam	Gas
Glukosa	±	—
Arabisona	±	—
Maltosa	±	—
Manitol	±	—
Xylosa	±	—
Laktosa	—	—
Sukrosa	—	—
Salicin	—	—
Inositol	—	—
Adonitol	—	—

6.6 Identifikasi serologi dari shigella tersangka

6.6.1 Buat larutan emulsi koloni yang berasal dari nutrient agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan menggunakan 2 ml larutan NaCl 0,85%..

6.6.2 Tes 1 tetes suspensi tersebut dengan menambahkan 0,05 ml antisera dari kelompok A, Al, B, C, Cl, C2 dan gunakan 0,85% larutan NaCl sebagai kontrol.

6.6.3 Penggumpalan terjadi dengan lambat sampai memerlukan waktu 3 - 4 menit.

6.6.4 Apabila terjadi reaksi negatif, rebus suspensi sel selama 30 menit untuk menghancurkan K antigen yang mengganggu. Ulangi tes aglutinasi seperti di atas dengan menggunakan antigen yang telah direhus.

6.6.5 Penggumpalan positif dengan kelompok antisera menunjukkan adanyaShigella secara presumptif; jangan membuat interpretasi akhir hanya berdasarkan reaksi ini.

Lampiran I: Media membiakan

Beberapa dari formulasi media tercantum dalam lampiran ini tersedia secara komersial baik dalam hentuk dehidrasi atau yang langsung dapat digunakan. Kecuali adanya ketentuan-ketentuan yang diperlukan, formulasi komersial tersebut telah dibuktikan baik untuk digunakan pada metode pengujian yang tercantum di atas. Akan tetapi instruksi untuk penyiapan media harus benar-benar ditaati.

Beberapa formulasi komersial berbeda dengan formulasi aslinya, sebab (1) adanya beberapa modifikasi yang telah dikembangkan atau (2) pembuat media telah menemukan bahwa beberapa perhedaan konsentrasi dan jenis bahan, kontrol pH yang telah baik, produktivitas, hambatan dan sebagainya dapat dipertahankan. Perubahan-perubahan ini biasanya mendorong kegunaan dari media untuk tujuan-tujuan tertentu. Perubahan-perubahan formula telah dibuktikan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisma jika dibandingkan dengan formula aslinya. Selain itu, pengawasan terhadap kualitas dari media komersial memerlukan pengujian-pengujian untuk produktivitas, hambatan dan sebagainya untuk setiap lot media dengan pengujian kontrol mikroorganisma terpilih secara hati-hati. Oleh sebab itu kualitas dari media dehirasi pada umumnya mempunyai tingkat yang lebih baik dibandingkan dengan media yang dibuat di laboratorium.

Merupakan suatu hal yang harus dilakukan untuk menginokulasi 1 set mikroorganisma kontrol pada setiap lot media. Pelaksanaan ini sangat disarankan terutama pada laboratorium yang berhubungan dengan riset dan pengembangan metode analisa yang tergantung pada karakteristik biokimia spesifik dari mikroorganisma.

1 Brain heart infusion broth (BHI)

Claf brain infusion	200 g
Beef heart infusion	250 g
Proteose peptone atau gelysate	10 g
Sodium chloride	5 g
Disodium phisphate (tidak mengandung air)	2,5 g
Dextrose	2 g
Aquadest	1 liter

Larutkan bahan dalam 1 liter aquadest. Panaskan perlahan-lahan jika perlu. Masukkan ke dalam botol atau tabung untuk disimpan, dan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. pH terakhir 7,4 ± 0,1.

2 Desoxycholate citrate agar (DC)

Meat infusion (babi, sapi, atau hati sapi	330 g
Peptone	10 g
Lactose	10 g
Sodium citrate	20 g
Sodium desoxycholate	5 g
Ferric ammonium citrate	2 g
Agar	17g
Neutral red	0,02 g
Aquadest	1 liter

Didihkan hingga tercampur secara homogen. Jangan diautoclave. Tuangkan ke dalam petridish, dan biarkan kering selama 2 jam dengan tutup sebagian terbuka, sebelum inokulasi. pH akhir 7,2 ± 0,1.

3 Eosin — Methylene blue agar (Levine)

Peptone	10g
Lactose	10g
Dipotassium phosphate ($K_2\ HPO_4$)	2 g
Agar	15g
Eosin Y	0,4 g
Methylene blue	0,065 g
Aquadest	1 liter

Didihkan campuran peptone, phisphate dan agar dalam 1 liter air dan tambahkan air sampai mendapat volume ash. Ambil 100 atau 200 ml dan autoclave selama 15 men* tidak lebih dari 121°C. pH akhir 7,1 ± 0,2. Sebelum digunakan lelehkan, dan pada setiap 100 ml tambahkan (a) 5 ml larutan lactose 20% steril (b) 2,0 ml larutan eosin Y 2% dan (c) 4,3 ml larutan methylene blue 0,15%.
Bila menggunakan produk dehidrasi didihkan untuk menghancurkan bahan dalam 1 liter air. Ambil 100 atau 200 ml dan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. pH akhir 7,1 ± 0,1.

4 Gram—Negative broth (GN)

Polypeptone (BBL) — Pantone (Difco)	20 g
Dextrose	1 g
D—Mannitol	2 g
Sodium citrate	5 g
Sodium desoxycholate	0,5 g
Dipotassium phosphate	4 g
Monopotassium phosphate	1,5 g
Sodium chloride	5 g

Aquadest	1 liter

Bagikan dalam tahung bertutup, dan autoclave selama 15 menit dengan tekanan 10 lb (116°C), atau sterilisasi dengan mengukus selama 30 menit, hindari pemanasan yang berlebihan. pH akhir 7,0 ± 0,2.

5 Koser's citrate broth

Sodium ammonium hydrogen phosphate ($NaNH_4HPO_4.4H_20$)	1,5 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2 HPO_4)	1 g
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2$ 0)	0,2 g
Sodium citrate (Na_3 C_6 Hs O., .$2H_2$ O)	3 g
Aquadest	1 liter

Larutkan dan bagikan tiap-tiap 10 ml ke dalam tahung reaksi (Ian autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. pH akhir 6,7 ± 0,2.

Formulasi yang tercantum pada AOAC dan standard Methods for the Exam]-nation of water and waste water dari APHA berbeda dengan formula dehydrated media. Akan tetapi, dehydrated media yang dibuat oleh Bioquest dan Difco telah dibuktikan cukup memuaskan.

6 Mallonate broth

Yeast extract	1 g
Ammonium sulfate, (NH_4)2 SO_4)	2 g
Dipotassium phosphate (K_2 HPO_4)	0,6 g
Monopotassium phosphate (KH_2 PO_4)	0,4 g
Sodium chloride	2 g
Sodium malonate	3 g
Glucose	0,25 g
Bromthymol blue	0,025 g
Aquadest	1 liter

Larutkan dan panaskan jika perlu. Pindahkan tiap 3 ml ke dalam tabung reaksi 13 x 100 mm, dan autoclave 15 menit dengan suhu 121°C. pH akhir 6,7 ± 0,2.

7 Media tes pergerakan (Semisold Media)

Beef extract	3 g
Peptone atau gelysate	10 g
Sodium chloride	5 g
Agar	4g
Aquadest	1 liter

Panaskan perlahan-lahan dengan pengadukan jika perlu. Didihkan 1-2 menit sampai merata. Pindahkan tiap-tiap 8 ml ke dalam wadah hertutup, dan kendurkan tutupnya. Autoclave 121°C, 15 menit. Untuk disimpan, kencangkan tutup. pH akhir 7,4.

8 Nutrient broth

Beef extract 3 g
Peptone 5 g
Aquadest 1 liter

Panaskan hingga larut, dan pindahkan tiap-tiap 10 ml ke dalam tabung reaksi atau 225 ml ke dalam labu, dan autoclave 121°C selama 15 menit. pH akhir 6,8 ± 0,2.

9 Potassium cyanide broth (Kcn)

Proteose peptone 3 atau polypeptone 3 g
Sodium chloride 5 g
Monopotassium phosphate (KH2 PO_4) 0,225 g
Disodium phosphate (Na2 HPO_4) 5,64 g
Aquadest 1 liter

Larutkan bahan dengan autoclave selama 15 menit dengan suhu 121°C. Dinginkan dan masukkan ke refrigerator pada suhu 5-8°C. pH akhir 7,6 ± 0,2. '.Larutkan 0,5 g KCN dalam 100 ml aquadest dingin steril (5-8°C). Dengan menggunakan pipet pengisap (jangan menggunakan mulut), secara aseptis tambahkan 15 ml larutan KCN dingin/liter basal broth dingin steril (atau 1,5 ml KCN ke 100 ml broth). Aduk perlahan-lahan hingga homogen, dan secara aseptis pindahkan tiaptiap 1-1,5 ml ke dalam 13 x 100 mm tabung reaksi. Dengan menggunakan teknik-teknik aseptis, segera tutup dengan gabus No. 2 yang dibalut dengan parafin. Siapkan gabus dengan mendidihkan dalam parafin 1 selama 15 menit. Letakkan gabus pada tabung sehingga parafin tidak mengalir ke dalam broth, tetapi membentuk penyekat yang baik antara bibir tabung dan gabus. Simpan medium pada suhu 5-8°C yang biasanya dapat tahan selama 2 minggu.

10 Selenite cystine broth (Medium 1)

Tryptone atau polypeptone 5 g
Lactose 4 g
Sodium selenite ($NaHSeO_3$) 4 g
Disodium hydrogen phosphate (Na. HPO_4) 10 g
Crystine 0,01 g
Aquadest 1 liter

Panaskan dengan pengadukan hingga merata. Pindahkan tiap-tiap 10 ml ke tabung-tabung reaksi 16 x 150 mm. Panaskan 10 menit dengan pengukusan. Jangan diautoclave. pH akhir 7.0 ± 0.1. Medium tidak steril. Gunakan pada hari yang sama saat dilakukan persiapan.

11 Selenite cystine broth (Medium 2)

North—Bartram modification, Appl. Microbiol. 1 : 130 (1935).
Polyptone (atau Tryptone) 5 g

(atau 4 g)

Lactose	4 g
$NaHSeO_3$	4 g
Na. HPO_4	5,5 g
KH. PO_4	4,5 g
L—cystine	0,01 g
Aquadest	1000 ml

Panaskan dengan pengadukan hingga merata. Pindahkan tiap-tiap 10 ml ke tabung-tabung reaksi 16 x 150 mm. Panaskan 10 menit dengan pengukusan. Jangan diautoclave. pH akhir 7,0 ± 0,1. Medium tidak steril. Gunakan pada hari yang sama saat dilakukan persiapan.

12 Triple Sugar Iron Agar (Tsi Agar)

Medium 1

Polypeptone	20 g
Sodium chloride	5 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
Glucose	1 g
$Fe(NH_4)_2(SO_4)2.6H_20$	0,2 g
$Na_2 S_2 0_3$	0,2 g
Phenol red	0,025 g
Agar	18 g

Medium 2

Beef extract	3 g
Yeast extract	3 g
Peptone	15 g
Proteose peptone	5 g
Glucose	1 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
$FeSO_4$	0,2 g
Sodium chloride	5 g
$Na_t S_2 0_3$	0,3 g
Phenol red	0,024 g
Agar	12 g

Kedua media dapat saling menggantikan untuk kegunaan umum. Apabila digunakan untuk V. parahaemolyticus, tambahkan 25 g NaCl/liter pada salah satu formula.

Larutkan bahan (1 atau 2) dalam 1 liter aquadest, campur hingga homogen, dan panaskan dengan pengadukan. Didihkan 1 menit hingga merata. Isi tabung 16 x 150 mm 1/3 nya, dan tutup hingga kondisi anaerob dapat dipertahankan selama penggunaan. Autoclave Medium 1

pada suhu 118°C, 15-17 menit dan Medium 2 pada suhu 121°C, 15 menit. Setelah medium membeku, miringkan tabung sehingga diperoleh agar tusukkan 2-3 cm dan agar miring 4-5 cm hingga beku. pH 7,3 ± 0,2.

13 Tryptone broth

Tryptone atau trypticase	10 g
Aquadest	1 liter

Apabila digunakan untuk V. parahaemolyticus, tambahkan 30 g NaCljliter. Larutkan, dan pindahkan tiap-tiap 5 ml ke dalam tabung-tabung reaksi dan autoclave 121°C, 15 menit.

14 Urea broth

Urea	20 g
Yeast extract	0,1 g
Monopotassium phosphat (KH_2 PO_4)	9,1 g
Disodium phosphate (Na2 HPO_4)	9,5 g
Phenol red	0,01 g
Aquadest	1 liter

Larutkan bahan dalam aquadest. Jangan dipanaskan. Sterilisasi dengan filter. Secara aseptis, pindahkan tiap 1,5-3 ml ke dalam tabung reaksi 13 x 100 mm steril. pH akhir 6,8 ± 0,2.

15 Xylose lysine decoxycholate agar (XLD)

Yeasy extract	3 g
L—lyzine	5 g
Xylose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Sucrose	7,5 g
Sodium desoxycholate	2,5 g
Ferric ammonium citrate	0,8 g
Sodium chloride	5 g
Agar	15 g
Phenol red	0,08 g
Aquadest	1 liter

Didihkan untuk mendapatkan larutan merata. Jangan terlalu lama dipanasi. Tuang dalam petridish secepatnya agar dingin. Pemaasan yang berlebihan akan menyebabkan endapan penguapan tetapi reaksi yang terjadi cukup memuaskan, meskipun koloni yang tumhuh akan sedikit lebih kecil. pH akhir 6,9 ± 0,2.

Lampiran 2: Reagensia dan diluen

1 Glucose broth (MR — VP Broth) — Buffered

Proteose peptone	7 g
Glucose	5 g
Dipotassium phosphate (K_2 HPO_4)	5 g
Aquadest	1 liter

Apabila digunakan untuk kultur V. parahaemolyticus gunakan 30 g NaCl per liter. Larutkan peptone, glucose dan potassium phosphate dalam 800 ml air dengan pemanasan yang sedang; saring, dinginkan hingga 20°C, encerkan hingga 1 liter. Pindahkan tiap 10 ml dalam tabung reaksi, dan autoclave selama 12—15 menit pada suhu 121°C. Maksimum pemanasan harus 30 menit. pH akhir 6,9 ± 0,2.

2 Indikator methyl red

Methyl red	0,01 g
Alcohol (ethyl) 957-	300 ml
Aquadest, cukup untuk membuat	500 ml

Larutkan methyl red dalam 300 ml alkohol, dan bua't hingga 500 ml dengan aquadest.

3 Larutan physiological salt (Steril)

Sodium chloride	8,5 g
Aquadest	1 liter

Larutkan 8,5 g NaCl dalam 1 liter aquadest. Autoclave 121°C, 15 menit dan dinginkan sampai suhu ruang.

4 Reagensia kovac

P—D imethylaminobenzaldehyde	5 g
Amyl alcohol atau isoamyl alcohol	75 ml
Hydrochloric (pekat)	25 ml

Larutkan P—Dimethylaminobenzaldehyde dalam amyl alcohol atau Isoamyl alcohol, dan kemudian perlahan-lahan tambahkan hydrochloric acid. Simpan dalam suhu 4°C. Untuk pengujian indole, tambahkan 0,2-0,3 ml reagensia ke 5 ml kultur bakteri pada tryptone broth yang telah diinkubasi 24 jam. Warna merah pada lapisan atas menunjukkan hasil positif. Untuk enteropatogenik E. Coli, juga diuji setelah 72 jam apabila pada 24 jam memberikan hasil negatif.

5 Reagensia tes voges — Proskauer (VP)

Larutan 1

a—Napthol	5 g
Alcohol (absolut)	100 ml

Larutan 2

Potassium hydroxide	40 g

Lakukan tes VP pada suhu ruang dengan memindahkan 1 ml kultur yang berumur 48 jam ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 0,6 ml ;a-napthol (larutan 1) dan 0,2 ml KOH 40% (larutan 2); kocok setelah penambahan tiap-tiap larutan. Untuk memperoleh reaksi yang cepat dan intensif, tambahkan beberapa kristal creatine dalam tes medium. Baca hasilnya setelah 4 jam penambahan reagenreagen. Tes VP positif bila terbentuk warna merah muda eosin.

Lampiran 3: Pewarnaan dan prosedur pewarnaan

1 Pewarnaan Gram

Hucker's Crystal Violet,

Larutan A

Chrystal violet (mengandung 90% warna)	2 g
Ethyl alcohol (95%)	20 ml

Larutan B

Ammonium oxalate	0,8 g
Aquadest	80 ml

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan saring melalui kertas penyaring kasar.

1.2 Gram's Iodine

Iodine	1 g
Potassium iodine	2 g
Aquadest	300 ml

Letakkan KI dalam mortar, tambahkan iodine, dan giling dengan alat penggiling selama 5-10 detik. Tambahkan 1 ml air dan gilirig, kemudian 5 ml air dan giling, lalu 10 ml dan giling. Pada saat ini KI dan iodine menjadi suatu larutan. Tuang dalam botol reagensia. Bilas mortar dan penggiling dengan air yang cukup hingga diperoleh volume 300 ml.

1.3 Hucker's counterstain (Larutan stok).

Sefranin 0 (disertifikasi)	2,5 g
Ethyl alcohol (95%)	100 ml

Penggunaannya, tambahkan 10 ml larutan stok ke dalam 90 ml aquadest.

Prosedur pewarnaan.

Fiksasi film yang kering karena di angin-anginkan dengan melewatkan film melalui api burner dengan cepat sebanyak 3-4 kali.

Warnai film selama 1 menit dengan larutan crystal violet ammonium oxalate, dan cuci sebentar dengan air mengalir (jangan lebih dari 5 detik).

Bubuhkan Gram iodine selama 1 menit. Cuci dengan air kran. Dekdorisasi dengan 95% ethyl alcohol sampai 15 dak ada lagi warna biru (sekitar 30 detik). Sebagai prosedur alternatif, rendam slide dengan alcohol, segera angkat, dan rendam lagi dengan alcohol selama 10 detik.

Cuci, dan hilangkan kelebihan air, dan bubuhkan sufranin counterstain selama 1 menit.

Beberapa dari organisme-organisme gram negatif tidak dapat segera melepaskan warna setelah diadakan pewarnaan dengan Hucker's crystal violet 1 : 5. Bila bekerja dengan gonococcus encerkan larutan crystal violet 1 : 5 dengan aquadest dan campur 1 bagian larutan crystal violet yang telah diencerkan tersebut dengan 4 bagian larutan amonium oxalate. Bila bekerja dengan bakteria anaerob, campur 1 bagian Hucker's crystal violet dengan 1 bagian sodium bicar⁻-bonate 1% seger asebelum pewarnaan.